



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 03 685 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 195 03 685.9
㉑ Anmeldetag: 30. 1. 95
㉒ Offenlegungstag: 1. 8. 96

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 P 1/00
C 12 P 21/00
C 12 P 19/34
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/50
G 01 N 33/68

DE 195 03 685 A 1

㉑ Anmelder:
InViTek GmbH, 13125 Berlin, DE

㉒ Erfinder:
Peters, Lars Erik, 10367 Berlin, DE; Scholoiko,
Lyubow A., Pustchino, RU; Bendzko, Peter, Dr.,
12623 Berlin, DE; Alachov, Juli B., Prof. Dr.,
Pustchino, RU

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische und deren Verwendung

⑤7 Es wird ein Verfahren und dessen Verwendung beschrieben zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden und gegebenenfalls Nukleinsäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

a) native oder artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische mit Reaktionspuffern, Cofaktoren und Substraten anwendungsfertig lagerstabil aufbereitet werden, wobei lediglich anwenderspezifische Schlüsselkomponenten (z. B. mRNS) für den Start der gewünschten enzymatischen Reaktion(en) fehlen, indem den Reaktionsgemischen in Lösung ein Stabilisierungsmittel zugeführt wird, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems erhöht bzw. nicht beeinträchtigt und andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung und Lagerung schützt,

b) die Reaktionsgemische durch Vakuumtrocknung lagerstabil gemacht werden und dann dauerhaft ohne Aktivitätsverlust bei 4°-10°C oder gegebenenfalls unter Verwendung eines inerten Gases oder von mineralischem Öl auch bei Raumtemperatur gelagert werden können,

c) der Anwender die anwendungsfertigen Reaktionsgemische vor dem Gebrauch lediglich durch die Zugabe des Ursprungvolumens H₂O rekonstruiert und die gewünschte(n) enzymatische(n) Reaktion(en) durch die Zuführung des oder der anwenderspezifischen Schlüsselkomponenten startet.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 06. 96 802 031/361

1/32

DE 195 03 685 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische aus nativen und gegebenenfalls artifiziellen enzymatisch aktiven Proteingemischen, die anwendungsfertig komplettiert sind und ohne Aktivitätsverlust bei 4° – 10°C oder gegebenenfalls bei Raumtemperatur gelagert werden können, sowie die Verwendung dieser Reaktionsgemische für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden und Nukleinsäuren.

Die Verwendung von Zellextrakten und Enzymgemischen zur Untersuchung komplexer biochemischer Reaktionsabläufe spielt eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie, Biochemie und molekularen Diagnostik.

Die zellfreie Proteinbiosynthese mit Hilfe von Lysaten aus Weizenkeimen, Kaninchen-Retikulocyten oder *Escherichia coli*-Zellen ist eine Schlüsselmethode bei der Erforschung von grundlegenden Mechanismen der Synthese, Faltung und posttranslationalen Reifung von Proteinen und Polypeptiden. Probleme des intrazellulären Targetings und der Reifung von Proteinen und anderen Biomolekülen werden mit Hilfe von Mikrosomen (ER-haltige Zellfraktion), isolierten Mitochondrien, Chloroplasten oder Zellkernextrakten untersucht.

Neben Anwendungen aus der Grundlagenforschung gewinnen multienzymatische Zellextrakte für die Proteinbiosynthese zunehmend Bedeutung für die Lösung präparativ-synthetischer bzw. diagnostischer Zielstellungen (21; 22). Die in-vitro Translation im semipräparativen Maßstab ist ein vielversprechendes Werkzeug für die Synthese von Proteinteilstücken zur Kartierung von Epitopen, katalytischen Zentren oder artifiziellen Antigen-determinanten. Auch bei den molekularbiologischen Methoden, wie der RNS-Synthese in-vitro (7), der Polymerasekettenreaktion (PCR) (2; 5) oder DNS-Sequenzierung (20), zeichnet sich ein Trend zur Verwendung multienzymatischer Reaktionssysteme ab. Die Leistungsfähigkeit und Synthesegenauigkeit von DNA- & RNS-Polymerasen kann durch die Kombination mit anderen Enzymen und Cofaktoren wie inorganische Pyrophosphatase, DNS-Bindungsproteine, RNase-Inhibitoren oder Exonukleasen gesteigert werden. Anspruchsvolle Anwendungen wie die Amplifikation von langen DNA-Fragmenten (> 10 kb) mit hoher Synthesegenauigkeit (LA-PCR), ausgehend von genomischer DNA, werden erst durch die Kombination von mehreren DNS-Polymerasen mit verschiedenen Eigenschaften möglich (2; 5).

Der breiten Anwendung von komplexen multienzymatischen Reaktionssystemen sind in der angewandten Forschung und der Diagnostik noch enge Grenzen gesetzt, weil nach dem gegenwärtigen Stand der Technik Probleme der Stabilität, der einfachen Handhabung und damit der Reproduzierbarkeit nur unzureichend gelöst sind. Der entscheidende Nachteil von komplexen multienzymatischen Reaktionssystemen gegenüber Reaktionsgemischen mit Einzelenzymen besteht in ihrer komplizierten technischen Handhabung. Die kompletten Reaktionsgemische mit allen Enzymen, Substraten und Cofaktoren sind als wäßrige Lösung weder bei Raumtemperatur noch bei –20°C stabil. Ein Problem, das die Stabilität von multienzymatischen Reaktionsgemischen beeinträchtigt, ergibt sich aus der Tatsache, daß die optimalen Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Art der Salze, Konzentration des Stabilisierungsmittels) für die Biosynthese meist von denen abweichen, die für die dauerhafte Konservierung der Enzymkomponenten und Cofaktoren optimal sind (10; 12; 18). Außerdem stellen die einzelnen Proteinkomponenten von Zellextrakten oder Enzymgemischen, je nachdem ob es sich um lösliche Enzyme, fibrilläre Strukturproteine, membranassoziierte Enzymkomplexe oder Nukleoproteide handelt, unterschiedliche Anforderungen an die Lagerbedingungen in Lösung. Herkömmlicherweise werden deshalb kommerzielle Reaktionssysteme für die in-vitro Transkription, Translation, PCR oder DNS-Sequenzierung in Form von Kits angeboten, in denen die Komponenten einzeln bereitgestellt werden. Im ungünstigsten Falle, wie das folgende Beispiel mit einem Reaktionsgemisch für die in-vitro Translation zeigt, müssen die verschiedenen Komponenten eines Kits nach Erhalt getrennt unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert werden. Dem Anwender obliegt die Aufgabe, für jede Versuchsprobe den Reaktionsansatz aus einer Vielzahl von Einzelkomponenten zusammenzumischen. Dieser Vorgang ist nur schwer automatisierbar. Mit der Anzahl der Proben potenziert sich der Zeitaufwand und die Wahrscheinlichkeit von Fehlern, und dadurch wird die Reproduzierbarkeit beeinträchtigt. Oft nimmt die Vorbereitung der Reaktionsgemische mehr Zeit in Anspruch als die eigentliche Versuchsdurchführung.

Beispielhaft läßt sich diese Problematik anhand der Zusammensetzung der Reaktionsgemische für die in-vitro Translation mit Hilfe zellfreier Extrakte darstellen:

Ausgangskomponenten	Konz.- Faktor	Lagertemperatur
1. Mastermix (HEPES-KOH, ATP, GTP, DTT, Spermidin, Kreatinphosphat)	12.5 X	-20°C
2. Aminosäuremix (19 L-Aminosäuren, 2.5 mM)	50 X	4°C
3. Hefe-tRNS (125 mg/ml)	25 X	-70°C-85°C
4. RNase-Inhibitor	—	-20°C
5. Zellextrakt (zellfreies Lysat, DTT, K-azetat, Mg-azetat, Kreatinphosphokinase, HEPES-KOH)	3 X	-85°C

Aufgrund der verschiedenen Temperaturanforderungen von -85°C , -20°C und 4°C ist der technische Aufwand für die Lagerung und den Transport der Ausgangskomponenten des Translationsgemisches hoch. Die Komponenten 1 und 4 sind selbst bei konstant -20°C nur wenige Monate stabil und müssen dann durch frische Lösungen ersetzt werden. Die Versendung von Zellextrakten und den anderen Reaktionskomponenten in löslicher Form muß in Trockeneis erfolgen, um ein Auftauen der Probe zu vermeiden. Auch die Lagerung ist insofern nicht unproblematisch, als daß man teure Tiefgefriertruhen, die üblicherweise mit flüssigem Stickstoff betrieben werden, mit technisch aufwendigen Absicherungen und Alarmanlagen benötigt.

Der empfindlichste und zugleich wichtigste Teil von Reaktionsgemischen für die in-vitro Translation sind die Zellextrakte, weil sie alle enzymatischen Komponenten für die ribosomale Proteinbiosynthese enthalten. Der komplexe biochemische Reaktionsablauf der mRNS-gesteuerten Polypeptidsynthese erfordert die kooperative Interaktion einer Vielzahl von Enzymen, Enzymkomplexen und Strukturproteinen mit unterschiedlicher Struktur und Stabilität. Anders als in Zellen, wo die Proteine des ribosomalen Translationsapparates makromolekulare Komplexe bilden, die durch Interaktionen mit den filamentösen Komponenten des Zytoskeletts stabilisiert werden, enthalten die zellfreien translationsaktiven Extrakte kein intaktes Zytoskelett mehr. Frei in Lösung können die makromolekularen Enzymkomplexe sehr leicht dissoziieren und verlieren damit ihre Reaktionsfähigkeit. Die einzig zuverlässige Methode für die Konservierung von löslichen Zellextrakten nach dem gegenwärtigen Stand der Technik ist die Lagerung im tiefgefrorenen Zustand bei -80°C – -85°C . Trotzdem ist damit eine Reihe von Problemen verbunden. Beim Einfrieren verlieren die Zellextrakte aus Weizenkeimen, Retikulozyten, oder E. coli-Zellen einen Teil ihrer enzymatischen Aktivität, da durch die Bildung von Wasserkristallen viele Proteine irreversibel geschädigt werden (12). Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der zellfreien Extrakte für aufeinanderfolgende Anwendungen führt bei Präparaten aus E. coli und Kaninchen-Retikulozyten zum vollständigen Verlust ihrer Aktivität, während sich nach eigenen Untersuchungen die Translationsaktivität von Weizenkeimextrakten um 30–50% nach jedem Einfrieren und Auftauen reduziert.

Die Instabilität von zellfreien Extrakten gegenüber wiederholtem Einfrieren und Auftauen zwingt den Anwender zu einem unwirtschaftlichen Verbrauch dieser teuren Reaktionskomponente. Für reproduzierbare Versuchsergebnisse darf jede Charge des translationsaktiven Zellextraktes nur einmal aufgetaut werden. Die Aktivitätsverluste bei der Lagerung im tiefgefrorenen Zustand sind höher, wenn man anstatt des hochkonzentrierten Zellextraktes das komplette anwendungsfertige Translationsgemisch einfriert. Bereits nach einmaligem Einfrieren und einer Woche Lagerung verliert ein komplettes Reaktionsgemisch etwa 60% der enzymatischen Aktivität, gemessen an der Endausbeute des Translationsproduktes, im Vergleich zu einem Reaktionsgemisch, das frisch aus den Einzelkomponenten zusammengestellt wurde. Offenbar spielt die Proteinkonzentration, die im unverdünnten Zellextrakt 3–4 mal höher ist als im fertigen Translationsgemisch, die entscheidende Rolle für die Stabilität der multienzymatischen Komponenten während des Einfrierens und im tiefgefrorenen Zustand.

Ähnlich verhält sich die Stabilitätsproblematik bei anderen Reaktionsgemischen für die Synthese und Modifizierung von Nukleinsäuren. Selbst einmaliges Einfrieren in wäßriger Lösung deaktiviert RNS- und DNS-Polymerasen vollständig, so daß sie nur unter Zuhilfenahme von Kryoprotektoren als Einzelenzymlösungen stabil bei -20°C gelagert werden können. Üblicherweise verwendet man Glycerin in einer Konzentration von mindestens 50% als Hilfsstoff, der die Bildung von schädlichen Wasserkristallen unterbindet. Aufgrund der notwendigen hohen Konzentration von Glycerin, oder gegebenenfalls anderer Hilfsstoffe wie Dimethylsulfoxid, Polyethylenglycol oder Rinderserumalbumin, können Kryoprotektoren nicht für die Tiefkühlagerung von kompletten Reaktionsgemischen eingesetzt werden (12; 6). Die Viskosität der resultierenden Lösungen beeinträchtigt die Reaktionsfähigkeit der enzymatischen Komponenten und ist ein Problem für nachfolgende Analysen des Reaktionsgemisches. Bei Konzentrationen $< 50\%$ sinkt auch die Lagerstabilität der Enzyme bei -20°C .

Überraschenderweise hat sich seit dem Erscheinen der ersten Veröffentlichungen über die zellfreie Proteinbiosynthese und posttranslationale Modifikation Mitte der 70-iger Jahre wenig an der Technologie zur Herstellung und Konservierung von enzymatisch aktiven Zellextrakten geändert. Prinzipiell bietet sich zu dem bereits beschriebenen Stand der Technik die Alternative der Lagerstabilisierung durch Gefriertrocknung an. Diese Methode wird vor allem zur Stabilisierung von Liposomen und Membranfraktionen (6), Einzelenzympräparaten

(1; 4; 8) oder von Reaktionsgemischen ohne Enzymkomponente (16) angewendet, wobei spezielle Zucker oder andere Polyole in Kombination mit bivalenten Metallionen oder Tensiden (13; 14; 15) die Denaturierung der Enzyme bzw. der Membranstrukturen durch den Wasserverlust verhindern. Als besonders effektiv zur Stabilisierung von Biomaterialien während der Gefriertrocknung hat sich der natürliche Zucker Trehalose erwiesen (19; 9; 10). Dieser Zucker wird von einigen Organismen, den sogenannten Cryptobionten, bei extremer Trockenheit in den Zellen angereichert, und sichert so die Überlebensfähigkeit dieser Organismen bei totalem Wasserverlust (17; 3).

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden technischen Probleme sind die Bereitstellung eines Herstellungsverfahrens, das die Nachteile des Standes der Technik bezüglich der stabilen Lagerung, des Transports sowie der anwendungsfertigen Aufbereitung von multienzymatischen Reaktionsgemischen für die Durchführung komplexer biochemischer bzw. molekularbiologischer Reaktionen vermeidet. Insbesondere soll das Verfahren auf eine Tiefkühlung der zu lagernden und zu transportierenden Proben verzichten können, sowie durch die Bereitstellung kompletter, d. h. bereits mit allen notwendigen Reaktionskomponenten versehenen Reaktionsgemische, den experimentellen Zeitaufwand für den Anwender erheblich reduzieren und die Reproduzierbarkeit erhöhen. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und 12. Die Unteransprüche betreffen spezielle Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich vom Stand der Technik zur Verwendung von Trehalose als Stabilisator zum ersten dadurch, daß komplette und multienzymatische Reaktionsgemische mit vielen Proteinkomponenten und nicht Einzelenzyme bzw. Reaktionsteilgemische ohne enzymatische Komponenten lagerstabil und anwendungsfertig hergestellt werden können. Zweitens wurden Bedingungen gefunden, unter denen die Trehalose ohne weitere Hilfsstoffe ausreichende Lagerstabilität gewährleistet und zusätzlich die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Reaktionsgemisches nach Rekonstituierung erhöht.

Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft multienzymatische Reaktionsgemische für die zellfreie Proteinsynthese (in-vitro Translation). Unter verschiedenen Bedingungen wurden 50 µl-Translationsgemische vakuumgetrocknet und in Wasser rekonstituiert. Die Reaktionsfähigkeit der so behandelten Reaktionsgemische wurde anhand der Translation von synthetischer Obelin-mRNA nachgewiesen. Obelin ist Lumineszenzprotein mit einem Molekulargewicht von 20 kDa. Der Nachweis des Translationsproduktes erfolgte sowohl quantitativ über die Messung der TCA-fällbaren radioaktiv markierten Proteine aus 5 µl des Translationsgemisches, als auch qualitativ über die elektrophoretische Analyse im SDS-PAG mit anschließender Radioautographie, nach 2 Stunden Inkubation bei 25°C. Es zeigte sich, daß die Proteinkomponenten des translationsaktiven Zellextraktes während des Trocknungsprozesses vollständig denaturieren, unabhängig davon, ob sie vorher tiefgefroren wurden oder nicht. Die Proteine lösten sich nicht mehr aus dem lyophilisierten Rückstand in Wasser auf und verblieben als trüber Niederschlag im Reaktionsgemisch. Ein radioaktiv markiertes Translationsprodukt (Obelin) ließ sich nicht nachweisen (Abb. 1/A, Spur 4 und 8), obwohl die TCA-fällbare radioaktiv markierte Proteine nachgewiesen werden konnten (Abb. 1/B). Dieser Effekt beruhte auf der unspezifischen Bildung des zur radioaktiven Markierung verwendeten [³⁵S]-Methionin an die denaturierten Proteine.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß bereits geringe Trehalosekonzentrationen (2,5% und 5%) ohne weitere Zusatzstoffe im Translationsgemisch ausreichen, die empfindlichen enzymatischen Komponenten des zellfreien Weizenkeimextraktes zumindest teilweise vor der Denaturierung während der Vakuumtrocknung und Rekonstituierung zu schützen (Abb. 1/A & 1/B). Der beste Effekt konnte mit einer Trehalosekonzentration von 10% erzielt werden. Etwa 84% der ursprünglichen Translationsaktivität, gemessen an der Syntheseausbeute, konnten im Vergleich zur Kontrollreaktion mit einem frisch angesetzten Reaktionsgemisch ohne Trehalose nach Lyophilisation und Rekonstituierung erhalten werden. Interessanterweise ergab sich aus den ersten Experimenten, daß der Stabilisierungseffekt der Trehalose nicht proportional mit der Konzentration im Translationsgemisch korreliert.

In 25 µl-, 50 µl- und 100 µl-Reaktionsgemischen mit 10% Trehalose, die entweder lyophilisiert oder einfach vakuumgetrocknet wurden, wurde die Kinetik der Obelintranslation nach der Rekonstituierung in Wasser bestimmt und mit der Synthesekinetik in der Kontrollreaktion verglichen. Als Kontrollreaktion diente jeweils ein frisch angesetztes Translationsgemisch ohne Trehalose mit gleichem Reaktionsvolumen. Zur Bestimmung der Translationskinetik von Obelin wurden in bestimmten Zeitabständen 3 µl-Proben dem Translationsgemisch entnommen und darin die TCA-fällbare radioaktiv markierte Proteinfraction quantifiziert (in cpm). Es zeigte sich, daß bei den 25 µl-Reaktionsansätzen die Kinetiken der Obelinsynthese in den unterschiedlich behandelten Translationsgemischen nicht signifikant voneinander bzw. von der Kinetik der Kontrollreaktion abwichen (Abb. 2). Das heißt mit anderen Worten, daß 25 µl-Translationsgemische ohne Verlust ihrer ursprünglichen Reaktionsfähigkeit lagerstabil durch Vakuumtrocknung gemacht bzw. rekonstituiert werden können, wobei es keine Rolle spielt ob sie vorher in einem Alkohol/Trockeneisbad schockgefroren werden.

Im Gegensatz dazu beeinflussten bei 50 µl- und 100 µl-Translationsgemischen die Bedingungen der Lagerstabilmachung die Effektivität der Konservierung der Translationsaktivität (Abb. 3/A & 3/B).

Die Unterschiede sind sowohl im Verlauf der Kinetiken als auch in der Differenz der der Syntheseausbeute des radioaktiv markierten Translationsproduktes nach 2 Stunden Inkubation zu erkennen. Bei der Lagerstabilmachung der 50 µl-Reaktionsgemische durch einfache Vakuumtrocknung (2,5 Stunden) gingen etwa 40% der ursprünglichen Translationsaktivität im Vergleich zur Kontrollreaktion verloren. Ein Einfrieren der Proben bei -50°C vor der Vakuumtrocknung (Lyophilisation) vermindert drastisch den Aktivitätsverlust der 50 µl-Translationsgemische während des Trocknungsprozesses. Die Translationsaktivität der rekonstituierten lyophilisierten Reaktionsgemische beträgt nahezu 100% im Vergleich zur Kontrollreaktion in einem frischen Translationsgemisch ohne Trehalose. Ähnlich verhält es sich mit den 100 µl-Translationsgemischen (Abb. 3/B).

Überraschenderweise stimulierte die Trehalose in der gleichen Konzentration, die auch die beste Konservie-

rung der Reaktionsfähigkeit während der Lagerstabilmachung und Rekonstituierung gewährleistet, die in-vitro Translation in unbehandelten frisch an gesetzten 50 µl- und 100 µl-Reaktionsgemischen (Abb. 3/A & 3/B). Die Syntheseausbeuten lagen etwa um 10–20% höher als in den entsprechenden Kontrollreaktionen ohne Trehalose. Ein positiver Effekt von Trehalose auf die ribosomale Proteinbiosynthese war bisher unbekannt. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Erhöhung der Translationsaktivität von zellfreien Extrakten durch Trehalose besonders relevant, da dadurch der Aktivitätsverlust von 10–20% (vergleiche die entsprechenden Kinetiken in Abb. 3/A & 3/B), der auch bei Lyophilisation der Translationsgemische eintritt, wieder ausgeglichen wird. So zeigen die rekonstituierten lagerstabilen Reaktionsgemische die gleiche Translationsaktivität wie die nach dem Stand der Technik aus Einzelkomponenten frisch zusammengestellten Translationsgemische ohne Trehalose.

Ein entscheidender Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Lagerstabilität der lyophilisierten anwendungsfertigen Reaktionsgemische. Es wurden mehrere komplette 100 µl-Translationsgemische unter Zugabe von 10% Trehalose lyophilisiert, dann luftdicht verschlossen und 1 bzw. 2 Wochen bei 4°–8°C im normalen Kühlschrank, bzw. bei Raumtemperatur (25°C) aufbewahrt. Danach wurden die lyophilisierten Reaktionsgemische wieder in Wasser rekonstituiert, die Kinetik der Obelintranslation bestimmt und mit Translationskinetik in einem frischen Reaktionsgemisch verglichen (Abb. 4). Die Ergebnisse demonstrieren, daß die Translationsaktivität der lagerstabil gemachten Reaktionsgemische nicht durch die Lagerung bei 4–8°C beeinträchtigt werden. Die Lagerung der lyophilisierten Translationsgemische bei RT führte allerdings zu einem starken Abfall der Reaktionsfähigkeit. Die Ursache dafür besteht darin, daß die hygroskopischen Azetat-Salze aus dem Translationspuffer nicht in die amorphe Glasmasse der Trehalose eingeschlossen werden, sondern sich als flockiger Rückstand darüber ablagern. Dieser Rückstand zieht das Wasser aus der darüber liegenden Luftsäule an, so daß das getrocknete Translationsgemisch durchfeuchtet wird. Ein zu hoher Wassergehalt und eine Lagertemperatur > 10°C setzt enzymatische Abbauprozesse in Gang, die instabile Substrate wie ATP und GTP und auch empfindliche enzymatische Komponenten deaktivieren. Dadurch verloren die getrockneten Translationsgemische bereits nach einer Woche Lagerzeit bei Raumtemperatur bis zu 70% ihrer Ausgangsaktivität. Dieser Aktivitätsverlust konnte nicht durch Zugabe von frischem ATP und GTP bei der Rekonstitution des Translationsgemisches ausgeglichen werden. Erfindungsgemäß kann dieses Problem gelöst werden, indem die lyophilisierten Reaktionsgemische mit einem inerten Gas überschichtet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht so die anwendungsfertige Aufbereitung von nativen und artifiziellen enzymatisch aktiven Proteingemischen mit Reaktionspuffern, Cofaktoren und Substraten in dem:

- den Reaktionsgemischen in wäßriger Lösung ein Stabilisierungsmittel, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems erhöht bzw. nicht beeinträchtigt und andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologischen Struktur während der Lagerstabilmachung Lagerung schützt,
- ggf. nach Einfrieren
- diese vakuumgetrocknet werden,
- ggf. eine Überschichtung mit inertem Gas oder mineralischem Öl erfolgt.

Die so erhaltenen lagerstabilen Reaktionsgemische werden erfindungsgemäß nach Rekonstituierung in Wasser durch Zuführung von anwenderspezifischen Schlüsselkomponenten je nach gewünschter enzymatischer Reaktion für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden oder ggf. Nukleinsäuren eingesetzt.

Die erfindungsgemäß hergestellten komplexen multienzymatischen Reaktionsgemische haben den Vorteil, daß sie bei 0–10°C oder ggf. nach Überschichtung mit einem inerten Gas bei Umgebungstemperatur (20–30°C) stabil gelagert und transportiert werden können. Dadurch entfällt der technisch und finanziell hohe Aufwand für die Anschaffung und Unterhaltung einer Tiefkühlrausrüstung, wie sie nach dem herkömmlichen Stand der Technik notwendig ist. Ihr zweiter entscheidender Vorteil besteht darin, daß sie anwendungsfertig mit allen notwendigen Reaktionskomponenten aufbereitet sind, so daß der Anwender die gewünschte Reaktion nur durch die Zugabe einer, maximal von zwei, Schlüsselkomponenten starten kann. Das ermöglicht die Umgehung der Nachteile des Standes der Technik bezüglich:

- der simultane Durchführung einer großen Zahl von Parallelversuchen,
- einer hohen Reproduzierbarkeit der enzymatischen Reaktionen,
- eines minimalen Zeitaufwand zur Versuchsvorbereitung,
- der Vermeidung von Fehlern bei Komposition von Reaktionsgemischen aus vielen Komponenten,
- der Automatisierung komplexer biochemischer multienzymatischer Reaktionsabläufe.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Beispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

1. Herstellung eines translationsaktiven Reaktionsgemisches auf der Basis eines Weizenkeimlysats unter Verwendung des Stabilisierungsmittels Trehalose

- 1.1 Herstellung eines anwendungsfertigen lagerstabilen Translationsgemisches aus Einzelkomponenten

Auf einem Eisbad bei 0°–4°C wird das anwendungsfertige Translationsgemisch in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aus folgenden Einzelkomponenten zusammenpipettiert:

- a) 4 µl Mastermix, bestehend aus 312 mM HEPES-KOH pH 7,6, 12,5 mM ATP, 1,25 mM GTP, 100 mM Kreatinphosphat, 3,12 mM und 25 mM DTT;
 b) 2 µl Aminosäuremix, bestehend aus 25 mM von 19 natürlichen L-Aminosäuren ohne L-Methionin (Alternativ dazu kann auch L-Leucin oder L-Lysin fehlen, je nachdem welche der Aminosäuren zur Markierung des Translationsproduktes eingesetzt wird);
 c) 16 µl Translationspuffer, bestehend aus 120 mM K-azetat, 5 mM Mg-azetat und 30 Gew.-% Trehalose;
 d) 3 µl RNase-freies Wasser (Millipore-18 MΩ);
 e) 2 µl Kreatinphosphokinase-Lösung (1.125 mg/ml);
 f) 2 µl Hefe-tRNS (125 mg/ml);
 g) 2 µl RNSse-Inhibitor (40–200 U);
 h) 16 µl Weizenkeimextrakt, bestehend aus Weizenkeimlysat mit einer Konzentration von 90 A₂₈₀/ml, 40 mM HEPES-KOH pH 7,6, 120 mM K-azetat, 5 mM Mg-azetat und 6 mM DTT.

Das Endvolumen des fertigen Translationsgemisches beträgt 50 µl. Für die Herstellung von 25 bzw. 100 µl Translationsgemischen müssen die Volumina der Ausgangskomponenten proportional verkleinert oder vergrößert werden.

1.2 Lagerstabilmachung der Translationsgemische

Die Komponenten der Translationsgemische werden vorsichtig im Reaktionsgefäß durchmischt und durch eine Impulszentrifugation am Boden des Gefäßes gesammelt. Unmittelbar danach werden die Reaktionsgefäße mit den Translationsgemischen bei geöffnetem Deckel in einem Alkohol/Trockeneisbad (–50°C) schockgefroren. Nach einer weiteren Minute werden die Reaktionsgefäße in eine Zentrifuge mit angeschlossener Vakuumpumpe und Kühlfalle (SpeedVac oder vergleichbare Geräte) übertragen und bei konstant 30°C vakuumgetrocknet. Translationsgemische mit einem Endvolumen ≤ 30 µl werden ohne vorheriges Schockfrieren vakuumgetrocknet. Die Zentrifugation während der Vakuumtrocknung sorgt dafür, daß sich die enzymatischen und nichtenzymatischen Komponenten des Translationsgemisches am Boden des Reaktionsgefäßes sammeln und tropfenförmig in die glasartige Masse der Trehalose versintert werden.

Nach 2,5 bis 3 Stunden wird der Trocknungsprozeß beendet, indem man die Vakuumzentrifuge vorsichtig belüftet. Der Luftereinlaß an der Zentrifuge ist mit einem Sterilfilter zu versehen, um die Kontamination der getrockneten Reaktionsgemische mit mikrobiellen Keimen zu verhindern. Die Reaktionsgefäße mit den eingetrockneten Translationsgemischen werden unter sterilen Bedingungen aus der Zentrifuge entfernt und unmittelbar danach luftdicht verschlossen.

In diesem Zustand werden die getrockneten Translationsgemische bei 0°C–10°C im Kühlschrank stabil gelagert werden. Zur Lagerung bei Temperaturen zwischen 20°–30°C werden die getrockneten Reaktionsgemische mit Stickstoff oder einem anderem inertem Gas, unmittelbar nachdem die noch offenen Reaktionsgefäße aus der Vakuumzentrifuge entnommen wurden, überschichtet.

1.3 Rekonstituierung der vakuumgetrockneten Translationsgemische und Durchführung der in-vitro Translation

Vor der Durchführung der in-vitro Translation werden die vakuumgetrockneten Reaktionsgemische mit Wasser in Lösung gebracht. Zunächst werden die vakuumgetrockneten Translationsgemische auf Eis gestellt. In Abhängigkeit vom jeweiligen Reaktionsendvolumen werden genau definierte Volumen Wasser auf die vakuumgetrockneten Rückstände pipettiert. Für einen 50 µl-Translationsansatz entspricht das einem Volumen von 32 µl, für 25 µl- und 100 µl-Translationsansätze entsprechend 16 µl und 64 µl. Durch vorsichtiges Mischen wird der glasartige Trehalosetropfen mit den Reaktionskomponenten vollständig aufgelöst. Während der Auflösung sollten die Translationsgemische von Zeit zu Zeit immer wieder auf Eis gestellt werden, um sie kühl zu halten. Insgesamt nimmt die Überführung der lagerstabilen Translationsgemische in Lösung nicht mehr als 5 Minuten ein.

Die Translationsreaktion wird durch die Zugabe von 4 µl (1 µg/µl) mRNS-Lösung, bzw. entsprechend 2 oder 8 µl mRNS-Lösung für die Reaktionsvolumina 25 und 100 µl, und 1 µl bzw. 0,5 oder 2 µl [³⁵S]-L-Methionin 1000 Ci/mmol gestartet. Die angegebenen Mengen der mRNS beziehen sich auf das im Fallbeispiel translatierte Lumineszenzenzym Obelin. Für andere Proteine muß die optimale mRNS-Menge jeweils empirisch in Titrationsversuchsreihen im Bereich von 1–10 µg für einen 50 µl Translationsansatz bestimmt werden, wobei aber das Volumen der zugegebenen RNS-Lösung konstant bleiben muß. Nach der Zugabe der mRNS und der radioaktiv-markierten Aminosäure werden die Translationsgemische kurz durchmischt, durch eine Impulszentrifugation am Boden des Gefäßes gesammelt, und dann bei 25°C in einem Thermostat inkubiert. Nach 0, 15, 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten werden jeweils 2 µl-Proben den Reaktionsgemischen entnommen, auf Filterscheiben aus Whatman 3 MM-Chromatographiepapier aufgetropft und an der Luft getrocknet. Der Nachweis des radioaktiv markierten Translationsproduktes Obelin erfolgt auf herkömmliche Weise durch eine Trichloressigsäurefällung der Proben auf dem Filterpapier und anschließender Waschung der gefällten Proben in eisgekühlter 5% Trichloressigsäure und Aceton. Zur Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität (in cpm) als Maß für die Menge des synthetisierten Translationsproduktes werden dann die Filterscheiben mit den behandelten Proben in 3 ml eines entsprechenden Scintillationsgemisches getaucht und auf einem entsprechenden Scintillationscounter vermessen. Die Entnahme von Proben aus dem Translationsgemisch zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglicht die Bestimmung der Kinetik des Translationsprozesses. Alternativ dazu kann der Nachweis des Translationsproduktes auch qualitativ durchgeführt werden, indem die Proben auf einem 12% SDS-PAG aufgetrennt und das markierte Translationsprodukt anschließend durch direkte Radioautographie mit einem Röntgenfilm

nachgewiesen wird.

Translationsgemische ohne Trehalose für die Kontrollreaktion zum Nachweis des Einflusses des Stabilisierungsmittels auf die Translationsaktivität und Lagerstabilität der Translationsgemische werden entsprechend dem obigen Schema angesetzt, allerdings unter Verwendung eines Translationspuffers (Komponente c) ohne Trehalose.

Literatur

1. Argall, M.E., Smith, G.D. (1993) The use of trehalose-stabilized lyophilized methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium X* for the detection of methanol. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30 (3), 491—497. 10
2. Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12), 2216—2220.
3. Burke, M.J. (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological Systems. *Membranes, Metabolism, and Dry Organisms*, AC. Leopold Ed. (Cornell University Press, Ithaca, NY), 3358—363.
4. Carpenter, J.F., Crowe, L.M., Crowe, J.H. (1987) Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 923 (1), 109—115. 15
5. Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M., Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12), 5695—5699.
6. Crowe, L.M. and J.H. Crowe (1992) Stabilization of dry liposomes by carbohydrates. *Dev. Biol. Stand.* 74, 285—294. 20
7. Cunningham, P.R., Ofengand, J. (1990) Use of inorganic pyrophosphatase to improve the yield of in vitro transcription reactions catalyzed by T7 RNA polymerase. *Biotechniques* 9 (6), 713—714.
8. Ford, A.W. and P.S. Dawson (1993) The effect of carbohydrate additives in the freeze-drying of alkaline phosphatase. *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (2), 86—93. 25
9. Franks, F. (1991) Freeze-drying: from empiricism to predictability. *Cryo-Lett.* 11, 93—110.
10. Franks, F. (1989) Improved freeze-drying: analysis of the basic scientific principles. *Process Biochem.* 24 (1), R3—R7.
11. Franks, F. and R.H.M. Hartley (1990) Storage of materials. European Patent Application No. 038 569.
12. Gekko, K. and S.N. Timasheff (1981) Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* 20, 4667—4686. 30
13. Goodnough, M.C. and E.A. Johnson (1992) Stabilization of botulinum toxin type A during lyophilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (10), 3426—3428.
14. Hazen, K.C., Bourgeois, L.D., Carpenter, J.F. (1988) Cryoprotection of antibody by organic solutes and organic solute/divalent cation mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* 267 (1), 363—371. 35
15. Hora, M.S., Rana, R.K., Smith, F.W. (1992) Lyophilized formulations of recombinant tumor necrosis factor. *Pharm. Res.* 9 (1), 33—36.
16. Kaijalainen, S., Karhunen, P.J., Lalu, K., Lindstrom, K. (1993) An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose. *Nucl. Acid Res.* 21 (12), 2959—2960. 40
17. Mackenzie, K.F., Singh, K.K., Brown, A.D. (1988) Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 134 (6), 1661—1666.
18. Privalov, P.L. (1987) Protein stability and hydrophobic interactions. *Biophysika* 32 (5), 742—760.
19. Roser, B. (1991) Trehalose drying a novel replacement for freeze-drying. *BioPharm* 4 (8), 47—53.
20. Tabor, S. and C.C. Richardson (1990) DNA sequence analysis with modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions. *J. Biol. Chem.* 265 (14), 8322—8328. 45
21. Spirin, A.S. (1992) Gene expression in cell-free systems on a preparative scale. *Bioorg. Khim.* 18 (10—11), 1394—1402.
22. Volyanik, E.V. et al. (1993) Synthesis of preparative amounts of biological active interleukin-6 using a continuous-flow cell-free translation system. *Anal. Biochem.* 214 (1), 289—294. 50

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische, **dadurch gekennzeichnet**, daß native oder artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische mit Reaktionskomponenten und einem Stabilisierungsmittel, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems nicht beeinträchtigt und gegebenenfalls erhöht und welches andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung und Lagerung schützt, in wäßriger Lösung kombiniert werden, gegebenenfalls eingefroren, durch Vakuumtrocknung und anschließend gegebenenfalls Überschichtung mit einem inertem Gas oder mineralischem Öl in einen bei 0°—10°C bzw. 20°—30°C lagerstabilen Zustand überführt werden, wobei die Menge des Stabilisierungsmittels zur Erhöhung der Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Reaktionsgemisches äquivalent zu der Menge ist, die für die Lagerstabilmachung des komplexen multienzymatischen Reaktionsgemisches benötigt wird. 55
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als native enzymatisch aktive Proteingemische Zellextrakte oder Fraktionen aus diesen einsetzt. 60
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische eine Mischung aus vorgereinigten Einzelenzymen, Cofaktoren und gegebenenfalls Strukturproteinen einsetzt. 65

nen einsetzt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reaktionskomponenten enzymatische und nichtenzymatische Cofaktoren, Enzymsubstrate, Nukleotide und Nukleoside oder deren Oligomere, Proteine, Peptide, Thiolverbindungen, RNS, DNS und gegebenenfalls Derivate jeder der obigen Substanzen einzeln oder in Kombination einsetzt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Stabilisierungsmittel ein chemisch inerter Zucker oder gegebenenfalls ein Zuckergemisch ist, der oder das im getrockneten Zustand eine amorphe Glasmasse mit einem Restwassergehalt von nicht mehr als 0,2 g H₂O/g Trockenmasse bildet.

6. Verfahren nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Stabilisierungsmittels in dem anwendungsfertigen Reaktionsgemisch in wäßriger Lösung nicht weniger als 5 Gew.-% und nicht mehr als 10 Gew.-% beträgt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Stabilisierungsmittel Trehalose ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakuumtrocknung in einer handelsüblichen Vakuumzentrifuge (z. B. SpeedVac) bei 30°C bis zu einem Restwassergehalt von 0,2 g H₂O/g, mindestens aber 2,5 Stunden, durchgeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktionsgemische mit einem Volumen \geq 30 μ l vor der Vakuumtrocknung bei -50°C in einem Alkohol/Trockeneisbad oder gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren werden.

10. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktionsgemische mit einem Volumen < 30 μ l direkt aus der Lösung vakuumgetrocknet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als inerte Gase Stickstoff, Helium oder Argon eingesetzt werden.

12. Verwendung der komplexen multienzymatischen lagerstabilen Reaktionsgemische nach Anspruch 1 bis 11 für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden oder Nukleinsäuren nach Rekonstitution in Wasser, wobei jeweils eine oder mehrere spezifische Schlüsselkomponenten hinzugegeben werden.

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schlüsselkomponenten radioaktiv- bzw. nichtradioaktiv-markierte Aminosäuren oder deren entsprechende aminoacyl-transfer RNS-Moleküle, radioaktiv- bzw. nichtradioaktiv-markierte Nukleotide oder gegebenenfalls deren Derivate oder Oligomere, natürliche oder artifizielle Boten-RNS, DNS verschiedenen Ursprungs oder Kombinationen aus den obigen Substanzen sind.

14. Verwendung nach Anspruch 12 und 13 für die zellfreie ribosomale Proteinbiosynthese und gegebenenfalls für die posttranslationale Modifikation von Peptiden, Polypeptiden und Proteinen.

15. Verwendung nach Anspruch 12 und 13 für die Replikation, reverse oder nichtreverse Transkription, gegebenenfalls Anreicherung oder Modifizierung von Nukleinsäuren.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1/A: Reaktionsfähigkeit der Translationsgemische nach Lagerstabilmachung und Rekonstituierung in Abhängigkeit von der Trehalosekonzentration

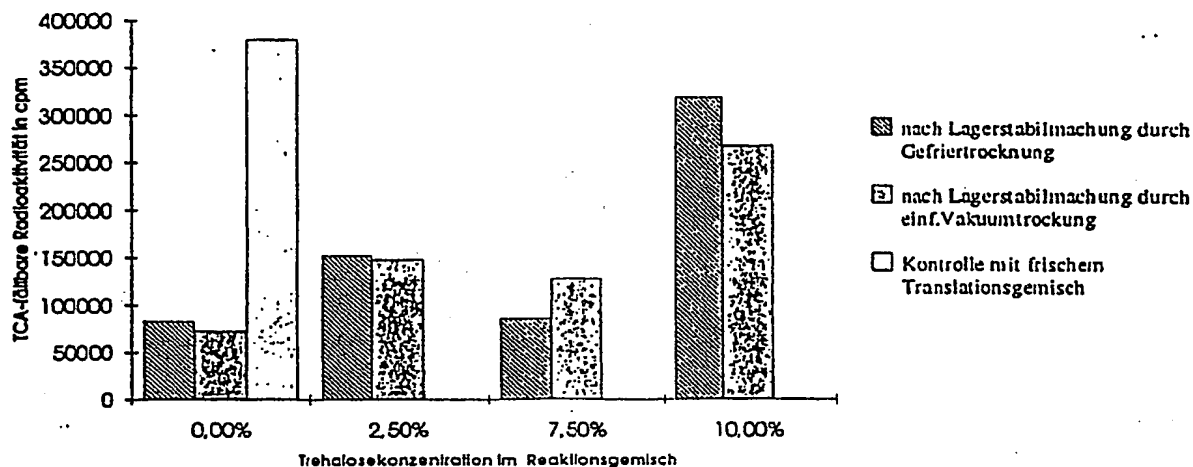


Abb. 1/B: Obelin-Translation in rekonstituierten Reaktionsgemischen bei verschiedenen Trehalosekonzentrationen

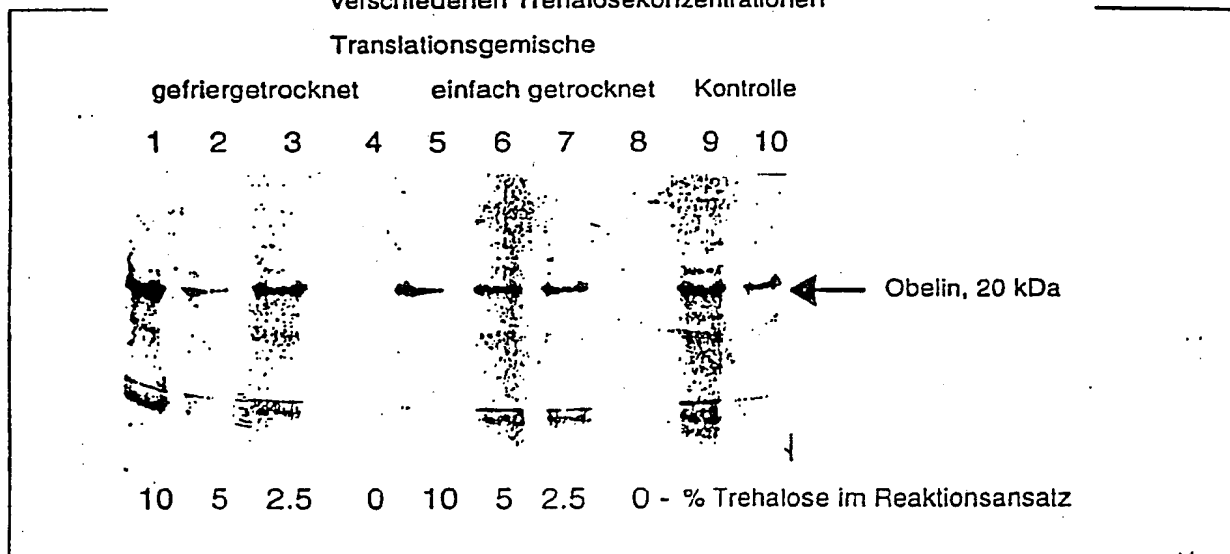


Abb. 2: Kinetiken der Obelintranslation in rekonstituierten 25µl-Translationsgemischen mit 10% Trehalose

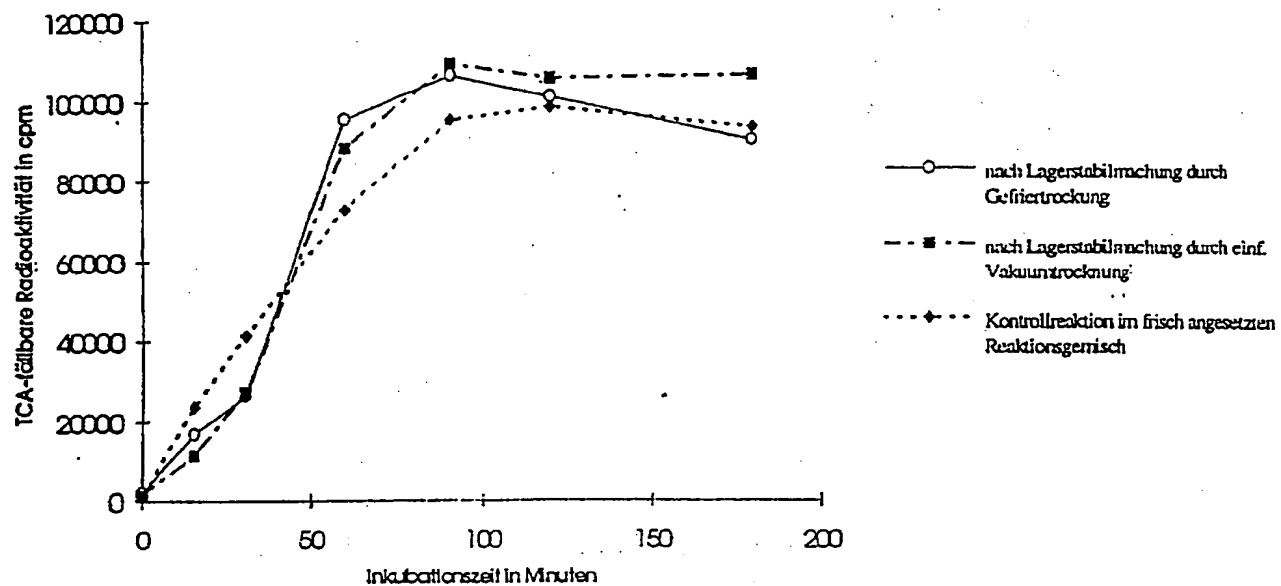


Abb. 3/A: Kinetiken der Obellntranslation in rekonstituierten und frischen 50µl-Translationsgemischen - Einfluß der Gefriertrocknung

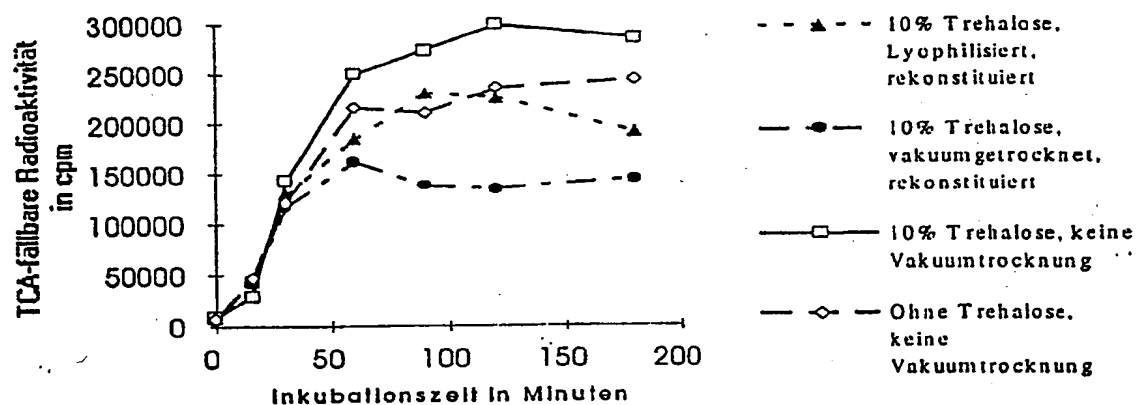


Abb. 3/B: Kinetiken der Obellntranslation in rekonstituierten und frischen 100µl-Translationsgemischen

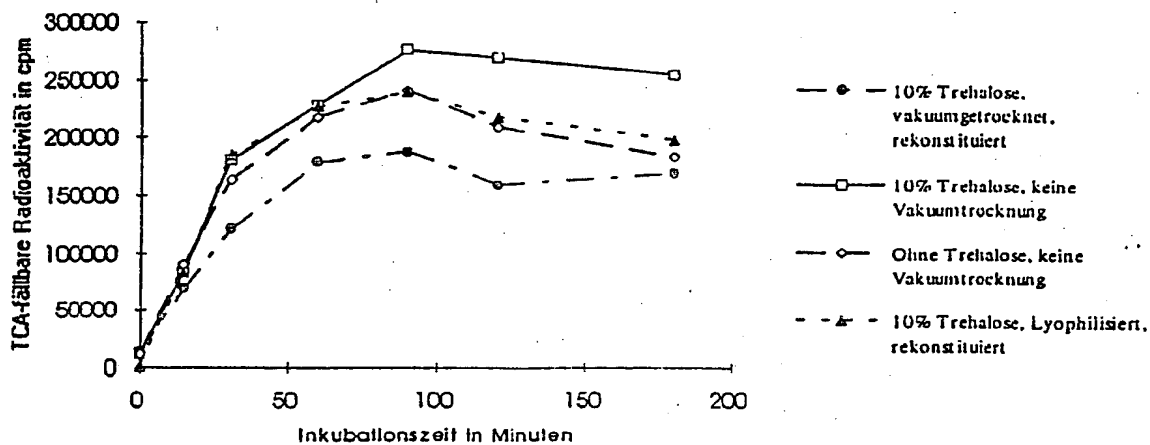


Abb. 4: Lagerstabilität von 50µl-Translationsgemischen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung, Lagerstabilmachung und Lagerbedingungen

